

漢方薬のマウス時計遺伝子発現に及ぼす影響

Effects of herbal medicine on the clock gene expression in mice

齋藤 恵祐 (Keisuke Saito) 指導：山内 兄人

【緒言】

我々は通常、24時間周期の明暗環境に合わせて生活している。これは体内に存在する時計機構すなわち体内時計が外界の明暗周期に正確に同調しているためである。体内時計のはたらきによる概日時計は生理機能や振る舞いの日内変動にとって必須の要素である。概日時計は視交叉上核に存在する中枢時計と様々な末梢組織に存在する末梢時計で構成されている。中枢時計は概日時計の主要な日周性のリセットシグナルである光刺激を受け取って末梢時計を同調させる。末梢時計は栄養状態など光以外の刺激を受け取り各末梢組織のはたらきを規定・調整している。概日時計の分子基盤は時計遺伝子と呼ばれる遺伝子産物のタンパク質が相互に作用し、フィードバックループを形成することによると考えられている。また概日時計の乱れは様々な疾患を引き起こすことから近年、治療的に体内時計に作用する物質を探索する研究が盛んにおこなわれている。本研究では、漢方薬が概日時計に作用するかどうか明らかにするため、マウスへの一過性の投与刺激による肝臓での時計遺伝子発現の変動を調べた(実験1)。また漢方薬を構成する生薬に関しても同様の作用を有するか調べるため、マウス胎仔繊維芽細胞 (MEF) において時計遺伝子のひとつである*Per2*の発現リズムを測定した(実験2)。さらにその結果見出された生薬に含まれる成分の抽出・分画およびその評価をおこなった(実験3)。なお本研究はすべて早稲田大学実験動物に関する指針に沿っておこなった(実験承認番号 2012-A061)。

【実験1】マウス肝臓での時計遺伝子発現に市販漢方薬が及ぼす影響

ICRマウスに対し市販漢方薬の経口投与を実施した。用量は製剤ごとに異なるためにそれらを基に算出した500–600 mg/kg BWとし、0.1mL/10g BWで投与した。投与2時間後に肝臓を採取し、時計遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCRで定量した。

時計遺伝子発現量の変動:市販漢方製剤128種のうち、30種に時計遺伝子発現に影響を及ぼすものが見出された。

本実験では補正で用いた*18s-rRNA*の値が不安定であったために定量的な解析はできず、傾向の判断に留まった。

【実験2】マウス胎仔繊維芽細胞 (MEF) の概日時計リズムに生薬が及ぼす影響

実験1で作用を認めた30種の漢方製剤とそれに類似する

生薬構成の漢方製剤13種、合わせて42種に用いられている生薬の一部34種を株式会社ツムラより提供いただいた。それらについて時計遺伝子*Per2*の下流にホタルルシフェラーゼのDNAを導入したマウス由来のMEFを用いた実験系により*Per2*の発現リズムを測定し、各生薬の時計遺伝子発現周期への影響を評価した。各生薬はそれぞれ100 μg/mLとなるように培地に添加した。

*Per2*発現リズム周期観察:評価をした34種の生薬のうち、白朮 (ビャクジュツ) と遠志 (オンジ) の2種に関して溶媒群と比べて有意な*Per2*発現リズムの周期短縮作用が観察された。その後の再実験の結果遠志にのみ再現性が確認された。また、遠志を含む市販漢方薬 (帰脾湯、加味帰脾湯) についても同様の作用が観察された。

評価した生薬34種のうち、遠志に*Per2*発現周期短縮作用が認められたため、そこに含まれる有効物質の探索をおこなうこととした。

【実験3】遠志に含有する周期短縮作用物質の探索

乾燥、切製された遠志粉末から熱水抽出法を用いて得たエキス粉末をKupchan分画により分画し、得られた分画物を評価した。その結果遠志エキス粉末と同様の作用が観察された分画物をODS flash クロマトグラフィ (ODS flash CC)により分画した。同様の評価を経て顕著な作用が観察された分画物を高速液体クロマトグラフィ (HPLC)を用いて分画し、同様の評価をおこなった。評価は実験2と同様の方法を用いて*Per2*発現周期短縮作用の確認をおこなった。Kupchan分画:クロロホルム層、60% メタノール層に*Per2*発現周期短縮作用が観察された。

ODS flash CC:クロロホルム層由来の移動相70% アセトニトリル分画物に顕著な作用が観察された。

HPLC:出力波形を元に分割した区分のひとつに顕著な作用が観察された。

高速液体クロマトグラフィの結果より、一部区分に顕著な作用が観察されたが、今後移動層濃度を検討することで作用物質の単離ができる可能性がある。単離が実現されれば核磁気共鳴分光法によりその構造が決定され、概日時計の基礎理論解明に貢献できる。また本研究は遠志の含まれる漢方製剤が、周期延長と関連する睡眠相後退症候群などの時計関連疾患の治療に応用できる可能性を示唆した。